

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
23. März 2006 (23.03.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/029775 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

C07K 14/78 (2006.01) C07K 1/30 (2006.01)
C07K 14/745 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/009730

(22) Internationales Anmeldedatum:
9. September 2005 (09.09.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 044 429.3
14. September 2004 (14.09.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **BIOTEST AG** [DE/DE]; Landsteinerstrasse 5, 63303
Dreieich (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **KRETSCHMAR,
Michael** [DE/DE]; In den Spitzäckern 2B, 63500
Seligenstadt (DE). **MÖLLER, Wolfgang** [DE/DE];
Graf-von-Stauffenberg-Strasse 32, 61440 Oberursel (DE).

(74) Anwälte: **KALHAMMER, Georg** usw.; Lederer &
Keller, Prinzregentenstr. 16, 80538 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR REMOVING FIBRONECTIN FROM PLASMA FRACTIONS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ENTFERNUNG VON FIBRONEKTIN AUS PLASMAFRAKTIONEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for separating fibronectin from plasma fractions by adjusting a pH value of less than 5.4 such that fibronectin is precipitated and extracted from the solution.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Abtrennung von Fibronektin aus Plasmafraktionen durch Einstellung eines pH-Werts auf unter pH 5,4, so dass Fibronektin präzipitiert und der Lösung entzogen wird.



WO 2006/029775 A1

Verfahren zur Entfernung von Fibronektin aus Plasmafraktionen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Abreicherung von Fibronektin aus Plasmafraktionen bei niedriger Ionenstärke durch Verschiebung des pH auf einen niedrigen Wert, so dass Fibronektin präzipitiert und der Lösung entzogen wird.

Fibronektin besteht aus zwei Polypeptidketten (α und β -Kette) mit einem Molekulargewicht von jeweils ca. 220 kDa. Seine lösliche Form kommt im Plasma und in anderen Körperflüssigkeiten vor, während seine unlösliche Form in der extrazellulären Matrix und in der Unterschicht von Membranen zu finden ist. Die Konzentrationen des Fibronektin im Humanplasma beträgt durchschnittlich 270 $\mu\text{g/ml}$. Aufgrund seiner Affinität zu Zelloberflächen und vielen verschiedenen Makromolekülen, besitzt es eine Vielzahl von Funktionen, z.B. Zell-Zell-Adhäsion, Zell-Substrat-Adhäsion, Zellteilung, Wundheilung u.v.a.. Die hohe Affinität zu Oberflächen und die Fähigkeit vernetzte Strukturen aufzubauen führt zu Problemen bei der Fraktionierung von Humanplasma zu therapeutischen Produkten. Es können Plasmafraktionen entstehen, deren hoher Gehalt an Fibronektin Filtrationen, Ultrafiltrationen und Chromatographie-Schritte zum Herstellen eines hochreinen Plasmaproduktes, z.B. eines Konzentrates an Gerinnungsproteinen deutlich erschwert. Häufig äußert sich das Problem im frühzeitigen Absättigen bzw. Blockieren von Filtern und Chromatographie-Säulen. Die als Gegenmaßnahme angewandte Vergrößerung der Filtrationsfläche oder Chromatographie-Säulenvolumina ist mit einer deutlichen Erhöhung der Herstellkosten verbunden.

Verschiedene Verfahren zur Herstellung isolierter Fibronektin-Fractionen wurden beschrieben:

Horowitz et al. (Transfusion 24, 357-362 (1984): Preparation of antihemophilic factor and fibronectin from human plasma cryoprecipitate) beschreiben ein Verfahren, bei dem ein Kryopräzipitatextrakt als Ausgangsmaterial dient. Nach einer Aluminiumhydroxid-Fällung wird der lösliche Überstand idealerweise bei 10°C und einem pH von 6,5 inkubiert, wobei Fibronektin ausfällt und über Zentrifugation entfernt wird. Um eine hochreine Fibronektin-

Präparation herzustellen, wird das wieder gelöste Fibronectin an eine Gelatine-Sepharose-Säule gebunden und mittels Natriumbromid enthaltenden Puffer bei pH 5,5 eluiert.

Ingham et al. (Molecular Immunology 20, 287-295 (1983): Interaction of plasma fibronectin with gelatin and complement C1q) stellen eine Untersuchung vor, bei der gezeigt wurde, dass Fibronectin in Anwesenheit von Gelatine aufgrund von spezifischen Interaktionen selektiv mit Polyethylenglykol (PEG) 4000 aus Lösungen gefällt werden kann. Dabei ergab sich, dass bei einer Gelatine-Konzentration von 0,4 mg/ml schon eine PEG 4000-Konzentration von 3% ausreicht, um 50% des Fibronectin zu fällen, während in Abwesenheit von Gelatine dazu 11% benötigt werden.

Das Europäische Patent 0011231 B1 stellt ein Verfahren vor, um kälteunlösliches Globulin (Fibronectin) durch Zugabe von 1,8 - 2,6 mol/l Aminosäuren, vorzugsweise Glycin, und 8 - 12% (w/v) Neutralsalz bei Temperaturen >18°C zu fällen und vom Überstand zu trennen.

US-Patent 4,406,886 beschreibt eine Methode zur Herstellung eines Faktor VIII-Präparates, bei der durch Zugabe von Zinksalzen Fibrinogen und Fibronectin in Form von Zink-Komplexen gefällt und entfernt werden.

Das US-Patent 4,278,594 stellt ein Verfahren zur Herstellung einer gereinigten Fibronectin-Fraktion vor. Dabei wird in einem Plasmapool unter Zuhilfenahme von Heparin Fibrinogen und Fibronectin gefällt. Das Präzipitat wird gelöst, auf eine DEAE-Zellulose-Säule aufgetragen und Fibrinogen und Fibronectin selektiv eluiert.

Im Europäischen Patent EP 0503991 B1 werden für die Herstellung eines von Willebrand Faktor-Präparates zwei Anionenaustauscher-Chromatographie-Schritte mit einer Gelatine-Affinitätschromatographie kombiniert. Dabei dient die Affinitätssäule vor allem der Abtrennung von Fibronectin.

Im US-Patent 5,981,254 wird ein Verfahren zur Herstellung eines Thrombin-Produktes beschrieben, das eine Fällung von Fibrinogen, Fibronectin und Faktor XIII beinhaltet. Dabei wird durch Zusatz von hohen Salzkonzentrationen bei neutralen pH-Werten eine Fällung erzielt. Alternativ wird beschrieben, die Fällung durch den Zusatz von sauren Salzen zu erzielen, die zu einem erniedrigten pH führen. Dieses Verfahren führt zu relativ hohen Ionenstärken, die für weitere Prozessschritte reduziert werden müssen.

Die beschriebenen Verfahren sind relativ aufwendig, insbesondere wenn ausschließlich eine Abtrennung des Fibronektins von der Wertfraktion als Ziel gesetzt wird. Häufig werden kostenintensive Affinitätschromatographien durchgeführt. Einfacher ist eine Fällung, die allerdings meist durch Zusetzen von z.B. Polyethylenglykol oder hohen Salzkonzentrationen erzielt wird. Der Zusatz von Fällreagenzien und hohen Salzkonzentrationen erhöhen die Gefahr, dass das gewünschte Produkt (z.B. von Willebrand Faktor) zum Teil mit aus dem Überstand gefällt wird.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines einfachen Verfahrens zur Abtrennung von Fibronektin aus Plasmafraktionen, so dass eine weitere Prozessierung zur Aufreinigung des Zielproteins erleichtert wird. Überraschenderweise hat sich gezeigt, dass durch eine einfache Titration auf einen niedrigen pH-Wert Fibronektin gefällt werden kann. Besonders überraschend war, dass die gebildeten Fibronektin-Fäden sich beim Rühren um den Rührer wickelten, dort einen "Klot" bildeten und so sehr einfach aus der Lösung entfernt werden konnten.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Abtrennung von Fibronektin aus einer Plasmafraktion, dadurch gekennzeichnet, dass man

- (i) den pH-Wert der Plasmafraktion auf unter pH 5,4 einstellt, so dass sich ein Niederschlag bildet und
- (ii) den gebildeten Niederschlag abtrennt.

Der Ausdruck "Plasmafraktion" bezeichnet eine Zusammensetzung, die aus Plasma erhalten wurde und verschiedene Plasmaproteine enthält. Die Plasmafraktion, die als Ausgangszusammensetzung in Schritt (i) eingesetzt wird, ist eine flüssige Zusammensetzung. Vorzugsweise ist die flüssige Zusammensetzung eine Lösung oder eine Suspension, am bevorzugtesten ist die Zusammensetzung eine Lösung.

In einer besonderen Ausführungsform ist die Plasmafraktion gelöstes Kryopräzipitat. Dieses gelöste Kryopräzipitat kann durch verschiedene Verfahren vorgereinigt sein. Beispiele sind Aluminiumhydroxid-Behandlung, Solvens-/Detergens-Behandlung und/oder Anionenaustauschchromatographie.

Die Konzentration an Natriumchlorid oder Kaliumchlorid in der Plasmafraktion ist vorzugsweise 50 bis 250 mM, bevorzugter 100 bis 200 mM, am bevorzugtesten 120 bis 150 mM.

Die Ionenstärke der Plasmafraktion liegt nach Schritt (i) und vor Schritt (ii) vorzugsweise unter 500 mM, bevorzugter unter 300 mM, am bevorzugtesten unter 200 mM. Vorzugsweise wird durch die Einstellung des pH-Werts in Schritt (i) die Ionenstärke nicht stark erhöht, d.h. sie bleibt vorzugsweise niedriger als 500 mM, bevorzugter niedriger als 300 mM, am bevorzugtesten niedriger als 200 mM.

Die Plasmafraktion kann beispielsweise folgende Puffersubstanzen enthalten: Citrationen, Acetationen, Phosphationen und/oder Aminosäuren.

Aminosäurezusätze werden vorzugsweise in Konzentrationen eingesetzt, die nicht zu einer Proteinfällung ohne pH-Verschiebung führen. Dies bedeutet beispielsweise für Glycin, dass die Konzentration unter 1,8 M liegt, vorzugsweise unter 500 mM, bevorzugter unter 200 mM, am bevorzugtesten unter 150 mM.

Die Konzentration an Fibronectin in der Plasmafraktion, die Schritt (i) unterworfen wird, ist in der Regel mindestens 0,05 g/l, vorzugsweise wenigstens 0,1 g/l, noch bevorzugter wenigstens 0,25 g/l, am bevorzugtesten wenigstens 0,5 g/l. Die Konzentration an Fibronectin in der Plasmafraktion kann beispielsweise 0,1 bis 5 g/l, vorzugsweise 0,1 bis 2 g/l sein.

Erfindungsgemäß wird in dem Verfahren zur Abtrennung von Fibronectin aus einer Plasmafraktion der pH-Wert der Plasmafraktion auf unter pH 5,4 eingestellt. Dabei bildet sich ein Niederschlag, der Fibronectin enthält. Vorzugsweise wird der pH-Wert auf unter pH 5,3 eingestellt, noch bevorzugter auf unter pH 5,2. Der eingestellte pH-Wert liegt somit vorzugsweise in einem Bereich von pH 4,5 bis unter 5,4, bevorzugt in einem Bereich von pH 4,7 bis 5,3, bevorzugter in einem Bereich von pH 4,8 bis 5,2, noch bevorzugter in einem Bereich von pH 4,9 bis 5,1.

In der Regel wird das Einstellen des pH-Werts durch Zugabe einer sauren Komponente erreicht. Als saure Komponente können verschiedene Säuren eingesetzt werden, beispielsweise Salzsäure, Phosphorsäure oder Essigsäure.

Die saure Komponente wird üblicherweise über einen bestimmten Zeitraum zugegeben, beispielsweise tropfenweise. Somit wird nach und nach ein pH-Wert im oben näher definierten Bereich eingestellt ("titriert").

Während und nach dem Einstellen des pH-Werts wird die Plasmafraktion vorzugsweise in Bewegung gehalten oder durchmischt, beispielsweise durch Rühren. Es ist weiterhin bevorzugt, dass nach Einstellen des pH-Werts die Plasmafraktion für einen bestimmten Zeitraum weiter durchmischt wird (z.B. durch Rühren), im allgemeinen für wenigstens 10 Minuten, vorzugsweise für wenigstens 20 Minuten, am bevorzugtesten für einen Zeitraum von 30 bis 90 Minuten. In diesem Zeitraum bilden sich klebrige Aggregate, die zu einem erheblichen Anteil Fibronektin erhalten. Daher ist es gemäß einer bevorzugten Ausführungsform vorgesehen, dass ein geeigneter Rührer, z.B. ein Anker- oder Paddelrührer eingesetzt wird, an dessen Rührblatt sich der Niederschlag anheftet. Das präzipitierte Fibronektin kann somit leicht der Lösung entzogen werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann in einem breiten Temperaturspektrum durchgeführt werden, z.B. von ca. 1°C bis ca. 37°C. Bevorzugte Temperaturbereiche sind 4 bis 35°C, bevorzugter 10 bis 30°C, am bevorzugtesten wird das Verfahren bei 20 bis 25°C durchgeführt.

Die für das erfindungsgemäße Verfahren eingesetzte Plasmafraktion ist vorzugsweise ein gelöstes Kryopräzipitat, das durch dem Fachmann an sich bekannte Verfahren hergestellt worden ist. So kann das gelöste Kryopräzipitat durch einen oder mehrere der Schritte Aluminiumhydroxid-Behandlung, Solvens-/Detergens-Behandlung und Anionenaustauschchromatographie vorgereinigt sein. Die Durchführung dieser Verfahren ist dem Fachmann an sich bekannt.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Entfernung von Fibronektin aus Plasmafraktionen kann die Konzentration an Fibronektin in der Plasmafraktion um wenigstens 50% verringert werden. Vorzugsweise wird die Konzentration an Fibronektin in der Plasmafraktion um 70 bis 99%, bevorzugter um 80 bis 99%, am bevorzugtesten um 90 bis 98% oder um 95 bis 98% verringert.

In einer besonderen Ausführungsform liegt der Verlust an Zielprotein, beispielsweise an VWF, bei höchstens 50%, bevorzugt bei höchstens 40%, bevorzugter bei höchstens 30%, noch bevorzugter bei höchstens 20%, am bevorzugtesten bei höchstens 10%.

Nach Abtrennung des Fibronektin enthaltenden Niederschlags aus der Plasmafraktion können weitere Reinigungsschritte erfolgen, um wenigstens einen Gerinnungsfaktor aufzureinigen. Vorzugsweise wird der Gerinnungsfaktor von Willebrand Faktor (VWF) weiter aufgereinigt. In einer besonderen Ausführungsform wird nach der pH-Fällung zur Abtrennung von Fibronektin eine Hydroxylapatit-Chromatographie durchgeführt. Hydroxylapatit ist eine Form von Calciumphosphat mit der Zusammensetzung $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ bzw. $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$, die als stationäre Phase für die Chromatographie von Proteinen, Nukleinsäuren und anderen Makromolekülen eingesetzt werden kann. Neben der kristallinen Form von Hydroxylapatit kann auch eine keramische Form verwendet werden, welche durch Sintern erhältlich ist. Hydroxylapatit kann beispielsweise von der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) bezogen werden. Deren keramisches Hydroxylapatit wird in zwei Formen (Typ 1 und Typ 2) zur Verfügung gestellt. Typ 1-Material hat aufgrund größerer Oberflächen eine höhere Bindungskapazität für kleinere Moleküle, z.B. kleine Proteine. Dagegen weist das Typ 2-Material größere Poren in den Partikeln auf, die ein Eindringen und damit eine bessere Bindung von großen Molekülen, z.B. DNA oder großen Proteinen, ermöglicht. Die Materialien weisen vorzugsweise folgende Eigenschaften auf:

Tabelle 1

	Dynamische Bindungskapazität	Nominale Porendurchmesser
Typ 1	>13,7 mg Lysozym/ml CHT*	600-800 Å
Typ 2	>6,8 mg Lysozym/ml CHT*	800-1000 Å

*CHT=Ceramic Hydroxy Apatite

Kristallines oder keramisches Hydroxylapatit ist frei verfügbar. Verfahren zu ihrer Herstellung sind im Stand der Technik bekannt.

In einer ersten Variante umfasst die Hydroxylapatit-Chromatographie, dass (i) die Plasmafraktion nach Abtrennung des gefällten Fibronektin-Niederschlags mit einer Hydroxylapatit-Matrix in Kontakt gebracht wird, so dass Fibrinogen und/oder Fibronektin an die Hydroxylapatit-Matrix gebunden wird, während VWF im wesentlichen nicht an die

Hydroxylapatit-Matrix gebunden wird, und gegebenenfalls anschließend (ii) ungebundener von Willebrand Faktor (VWF) von der Hydroxylapatit-Matrix getrennt wird. Diese Variante wird in der vorliegenden Anmeldung als "Durchlaufchromatographie" bezeichnet, da VWF nicht an die Hydroxylapatit-Matrix bindet. Das Verfahren kann in Form einer Säulenchromatographie oder im Batch-Verfahren durchgeführt werden; die Durchführung einer Säulenchromatographie ist bevorzugt. Im Fall einer Säulenchromatographie befindet sich VWF im Durchlauf und wenigstens ein verunreinigendes Protein, z. B. Fibronektin und/oder Fibrinogen, wird an das Hydroxylapatit gebunden.

Die Hydroxylapatit-Chromatographie wird gemäß dieser ersten Variante bei einem pH-Wert von 6,5 bis 8,5, vorzugsweise von 6,8 bis 8,5, bevorzugter von 6,8 bis 7,5, am bevorzugtesten von 7,0 bis 7,5 durchgeführt. Üblicherweise haben Lauf-, Wasch- und Elutionspuffer, sowie die aufzutragende Proteinlösung den gleichen pH-Wert. Es sind aber auch Varianten praktikabel, bei denen diese Lösungen unterschiedlichen pH-Werte aufweisen. Die Zusammensetzung, die mit der Hydroxylapatitmatrix in Kontakt gebracht wird, enthält vorzugsweise Natriumphosphat und/oder Kaliumphosphat. Die Gesamtkonzentration an Natriumphosphat und/oder Kaliumphosphat in der Lösung ist beispielsweise 0 bis 100 mM, vorzugsweise 10 bis 50 mM, am bevorzugtesten 20 bis 40 mM, d. h. als Laufpuffer kann eine Pufferlösung mit den genannten Konzentrationen eingesetzt werden. Die Zusammensetzung wird bei einer niedrigen Salzkonzentration von 0 – 100 mM Kalium- oder Natriumphosphat, bevorzugt bei 10 – 50 mM, bei einem pH von vorzugsweise 6,8 bis 8,5, besonders bevorzugt bei einem pH von 7,0 – 7,5, auf eine Hydroxylapatit-Säule aufgetragen. Das Hydroxylapatit ist in dieser Variante vorzugsweise keramisches Hydroxylapatit, besonders bevorzugt vom Typ 1, wie von Bio-Rad (München, Deutschland) vertrieben. Unter diesen Bedingungen bindet der Großteil der VWF-Moleküle nicht an die Matrix und befindet sich im Durchlauf, während Verunreinigungsproteine, wie z.B. Fibrinogen oder Fibronektin, zum Großteil an die Matrix binden.

Durch die Durchlaufchromatographie können Präparationen erhalten werden, die nur geringe Mengen an Fibrinogen und Fibronektin enthalten. In der Regel ist die Konzentration an Fibrinogen-Antigen in der Durchlaufraktion niedriger als 25 µg/ml, bevorzugt niedriger als 15 µg/ml, bevorzugter niedriger als 10 µg/ml, am bevorzugtesten höchstens 5 µg/ml. Die Konzentration an Fibronektin-Antigen in der Durchlaufraktion ist üblicherweise niedriger als 250 µg/ml, bevorzugt niedriger als 150 µg/ml, bevorzugter niedriger als 100 µg/ml, am bevorzugtesten höchstens 50 µg/ml. Die Konzentration an Fibrinogen-Antigen und

Fibronektin-Antigen kann durch an sich bekannte Verfahren bestimmt werden, z. B. wie in den Beispielen der vorliegenden Anmeldung beschrieben.

Die Konzentration an Fibrinogen in der Durchlaufraktion ist vorzugsweise niedriger als 10%, bevorzugter niedriger als 5%, noch bevorzugter niedriger als 2,5% der Konzentration an Fibrinogen in der Auftragslösung (vor Durchlaufchromatographie). Die Konzentration an Fibronektin in der Durchlaufraktion ist vorzugsweise niedriger als 10%, bevorzugter niedriger als 5%, noch bevorzugter niedriger als 2,5% der Konzentration an Fibronektin in der Auftragslösung (vor Durchlaufchromatographie). Die Durchlaufchromatographie ist besonders zur Aufreinigung von VWF geeignet. So ist die VWF-Ausbeute der Durchlaufchromatographie (bezogen auf die Massenbilanz) in der Regel höher als 50%, bevorzugt höher als 60%, am bevorzugtesten höher als 75%. Die spezifische Aktivität (Ristocetin-Cofaktor-Aktivität pro mg Gesamtprotein) kann durch die Durchlaufchromatographie um wenigstens 100%, vorzugsweise um wenigstens 150%, am bevorzugtesten um wenigstens 200% erhöht werden.

Bei einer Aufreinigung von VWF ist eine zweite Variante der Hydroxylapatit-Chromatographie besonders vorteilhaft. In dieser zweiten Variante wird VWF an die Hydroxylapatit-Matrix gebunden und anschließend eluiert. Diese Variante wird in der vorliegenden Anmeldung als "bindende Chromatographie" bezeichnet. Üblicherweise umfasst die bindende Chromatographie, dass

- (a) VWF an die Hydroxylapatit-Matrix gebunden wird,
- (b) Verunreinigungen bei niedrigerer Salzkonzentration herausgewaschen werden und
- (c) anschließend die VWF-haltige Wertfraktion bei höherer Salzkonzentration eluiert wird.

In Schritt (a) wird eine Lösung, die VWF und ein oder mehrere verunreinigende Proteine enthält, mit der Hydroxylapatit-Matrix in Kontakt gebracht. Die Gesamtkonzentration an Natrium- und/oder Kaliumphosphat in dieser Lösung ist üblicherweise 0 bis 200 mM, vorzugsweise 1 bis 200 mM, bevorzugter 1 bis 50 mM, am bevorzugtesten 10 bis 30 mM.

In dem Waschschrift (b) wird die Hydroxylapatit-Matrix mit einem Puffer niedriger Salzkonzentration gewaschen. Die Gesamtkonzentration an Natrium- und/oder

Kaliumphosphat in diesem Waschpuffer ist in der Regel 100 bis 300 mM, vorzugsweise 150 bis 250 mM, am bevorzugtesten 180 bis 240 mM.

In Schritt (c) kann die VWF-haltige Wertfraktion mit einem Puffer höherer Salzkonzentration eluiert werden. Der Elutionspuffer enthält in der Regel 200 bis 500 mM, vorzugsweise 250 bis 400 mM Natrium- und/oder Kaliumphosphat.

Durch Verschiebung der Salzkonzentrationen können Ausbeute und Reinheit verändert werden. Je höher die Salzkonzentration im Waschpuffer ist, desto sauberer ist die erhaltene Wertfraktion. Die VWF-Ausbeute erniedrigt sich dadurch allerdings. Weiterhin beeinflusst der gewählte pH-Wert die optimale Salzkonzentration für den Waschpuffer. Je niedriger der pH-Wert ist, desto stärker ist die Bindung von VWF an die Hydroxylapatit-Matrix. Entsprechend können die gewählten Salzkonzentrationen bei niedrigen pH-Werten höher sein, bei höheren pH-Werten hingegen niedriger. Die (bindende) Hydroxylapatit-Chromatographie wird bei einem pH-Wert von 5 bis 7,5, vorzugsweise von 5,5 bis unter 6,8, am bevorzugtesten von 6,0 bis 6,5 durchgeführt. Üblicherweise haben Lauf-, Wasch- und Elutionspuffer, sowie die aufzutragende Proteinlösung den gleichen pH-Wert. Es sind aber auch Varianten praktikabel, bei denen diese Lösungen unterschiedlichen pH-Werte aufweisen.

In dieser zweiten Variante wird die VWF-haltige Lösung, z.B. die Plasmafraktion nach pH-Fällung und Abtrennung des Fibronektin-Niederschlags, bei einer niedrigen Salzkonzentration, vorzugsweise 0 – 100 mM Kalium- oder Natriumphosphat, besonders bevorzugt bei 10 – 30 mM, bei einem pH-Wert von 5,5 – 6,8, bevorzugt 6,0 – 6,5, auf eine Hydroxylapatit-Säule, z.B. keramisches Hydroxylapatit Typ 2 aufgetragen. Der Großteil der VWF-Moleküle wird unter diesen Bedingungen gebunden. Durch Waschen mit einer Lösung mit höherer Salzkonzentration mit z.B. Kalium- oder Natriumphosphat, beispielsweise 230 mM Natriumphosphat pH 6,0, können Verunreinigungen, z.B. Fibronektin, ausgewaschen werden. Die Wertfraktion wird anschließend mit hochkonzentrierten Salzlösungen, z.B. Phosphatlösungen, wie z.B. 400 mM Natriumphosphat pH 6,0, eluiert.

Durch die bindende Chromatographie können VWF-Präparationen erhalten werden, die praktisch keine nachweisbaren Mengen an Fibrinogen und Fibronektin mehr enthalten. Wenn die Auftragslösung, die mit der Hydroxylapatit-Matrix in Kontakt gebracht wird, eine

Plasmafraktion ist und/oder Fibrinogen oder Fibronectin enthält, kann eine praktisch quantitative Entfernung der verunreinigenden Proteine Fibrinogen und Fibronectin aus der Lösung erzielt werden. So ist die Konzentration an Fibrinogen in der Elutionsfraktion vorzugsweise niedriger als 25% der Konzentration an Fibrinogen in der Auftragslösung (vor der bindenden Chromatographie). Die Konzentration an Fibronectin in der Elutionsfraktion ist vorzugsweise niedriger als 10%, bevorzugter niedriger als 5% der Konzentration an Fibronectin in der Auftragslösung (vor der bindenden Chromatographie). Die Konzentrationen an Fibrinogen bzw. Fibronectin in der Elutionsfraktion (Wertfraktion) sind in der Regel unterhalb der Nachweisgrenze von ca. 1 µg/ml.

Durch die bindende Hydroxylapatit-Chromatographie können VWF-Präparationen mit hoher spezifischer Aktivität erhalten werden. Die spezifische Aktivität in der Elutionsfraktion kann höher als 50 E/mg Protein sein, bevorzugt ist sie höher als 75 E/mg Protein, bevorzugter höher als 85 E/mg Protein, am bevorzugtesten wenigstens 100 E/mg Protein. Die VWF-Aktivität wird bestimmt mit dem Ristocetin-Cofaktor-Assay, der die Bindungsfähigkeit von VWF an den Plättchenrezeptor Glycoprotein Ib/IX unter dem Einfluss des Antibiotikums Ristocetin ermittelt. Die spezifische VWF-Aktivität kann bestimmt werden wie in den Beispielen beschrieben.

Für die Herstellung eines besonders reinen VWF-Präparates können die beiden beschriebenen Varianten der Hydroxylapatit-Chromatographie miteinander oder mit anderen Reinigungstechniken kombiniert werden. Als besonders geeignet hat sich nämlich gezeigt, zunächst nach dem oben beschriebenen Verfahren eine Durchlaufchromatographie mit Hydroxylapatit zur Abreicherung der Hauptverunreinigungen durchzuführen. Anschließend wird die Wertfraktion beispielsweise mit 1 M HCl auf pH 6,0 titriert. Die Probe wird, wie für die bindende Chromatographie beschrieben, auf eine Hydroxylapatit-Säule aufgetragen. VWF-Moleküle werden gebunden und selektiv eluiert. In einer dritten Variante der Hydroxylapatit-Chromatographie wird daher zunächst eine Durchlaufchromatographie mit Hydroxylapatit durchgeführt, wobei VWF nicht an die Hydroxylapatit-Matrix bindet, und anschließend die Durchlaufaktion unter bindenden Bedingungen rechromatographiert und die VWF-Fraktion eluiert. Für die Durchlaufchromatographie ist es sinnvoll, aber nicht notwendig, Phosphationen als Puffersubstanz zu verwenden. Für die Elution von VWF bei der bindenden Chromatographie ist Phosphat ein spezifisches Agens.

Die in dieser Anmeldung beschriebenen Ausführungsformen können miteinander kombiniert werden.

Lösungen, die mit dem hier beschriebenen Verfahren von Fibronektin befreit werden können, sind Plasmafraktionen, aus denen andere Komponenten aufgereinigt werden sollen. Dies können Plasmafraktionen sein, aus denen beispielsweise Gerinnungspräparate, wie der von Willebrand Faktor, gewonnen wird. Die Plasmafraktionen, die mit diesem Verfahren aufgearbeitet werden können, enthalten als Hauptverunreinigung Fibronektin, das in Konzentrationen von $> 0,1$ g/l vorliegt. Die Lösung wird durch Zugabe einer sauren Komponente, beispielsweise 1 M Salzsäure auf einen pH-Wert $< 5,4$, vorzugsweise 5,4 bis 4,8, besonders bevorzugt 5,2 bis 5,0, titriert. Unter Rühren wird die Lösung > 10 Minuten, bevorzugt 30 bis 90 Minuten inkubiert. Es bilden sich klebrige Aggregate, die sich bei Verwendung eines geeigneten Rührers, z.B. eines Anker- oder eines Paddelrührers, an das Rührblatt heften und so der Lösung entzogen werden. Dies hat den Vorteil, dass ein Großteil des Niederschlags nicht durch technisch aufwendige und kostenintensive Weise mittels Filtration oder Zentrifugation entfernt werden muss. Die Effektivität der Fadenbildung wird durch die Ionenstärke beeinflusst. Sehr gute Ergebnisse wurden beispielsweise mit Pufferlösungen erzielt, die 100 - 200 mM NaCl, bevorzugt 120 - 150 mM NaCl enthielten. Das Verfahren kann in einem breiten Temperatur-Spektrum von, z.B. 4°C bis 35°C durchgeführt werden. Bevorzugt wird das Verfahren bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Abreicherungs-effektivität für Fibronektin hängt von der Zusammensetzung der Lösung ab und liegt typischerweise zwischen 70% und 95%.

Die nachfolgenden Ausführungsbeispiele erläutern die Erfindung näher.

Beispiel 1: Fällen von Fibronektin im Labormaßstab bei verschiedenen Temperaturen

Als Ausgangsmaterial wurde eine Kryopräzipitat-Lösung verwendet, die durch Aluminiumhydroxid-Fällung, Polysorbat 80 / TNBP-Behandlung und Anionenaustausch-Chromatographie, wie z.B. im WO 9315105 A1 beschrieben, vorgereinigt wurde. Für die Isolierung des enthaltenen von Willebrand Faktors (VWF) musste zunächst störendes Fibronektin entfernt werden. Die Lösung enthielt als Hauptkomponenten 0,18 g/l VWF-Antigen (VWF-Ag), 0,05 g/l Fibrinogen-Antigen und 1,49 g/l Fibronektin-Antigen. Die Lösung enthielt folgende Puffersubstanzen: 10 mM Citrat, 160 mM NaCl, 120 mM Glycin, 1

mM CaCl₂. Jeweils 1 l der Lösung wurden bei 4°C, 20°C bzw. 35°C unter Rühren durch Zugabe von 1 M HCl auf pH 5,2 titriert. Während des Inkubierens für 60 min wickelten sich in allen 3 Fällen weiße Fibronektin-Fäden um den Rührer und bildeten einen massiven Klot. Die verbleibende Lösung ließ sich problemlos mit einem Membranfilter klarfiltrieren.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Ausgangsprobe und der gefällten 4°C-, 20°C- und 35°C-Probe

	VWF-Ag [g/l]	Fibrinogen-Ag [g/l]	Fibronektin-Ag [g/l]
Ausgang	0,18	0,05	1,49
4°C	0,14	0,01	0,09
20°C	0,15	0,02	0,04
35°C	0,16	0,02	0,1

Es zeigte sich, dass im Temperaturbereich von 4°C bis 35°C eine pH-Shift-Präzipitation hervorragend geeignet ist, um Fibronektin in großen Mengen abzutrennen. Der Verlust am Zielprotein VWF liegt hier bei maximal 22% (4°C) bei einer Abreicherung an Fibronektin von mindestens 93% bis 97%.

Die Konzentration an VWF-Antigen wurde mit Hilfe des STA[®] Compact der Firma Diagnostica Stago (Roche Diagnostics, Mannheim) und deren Test-Reagenzien (STA LIA vWF) bestimmt.

Für die Bestimmung der Menge an Fibrinogen-Antigen und Fibronektin-Antigen wurden nephelometrische Methoden zur quantitativen Bestimmung der Fibrinogen-Antigen- und Fibrinogen-Antigen-Konzentration im Beckman-Array[®] 360 (Beckman Coulter, Monheim) verwendet.

Beispiel 2: Abtrennung von Fibronektin bei einem präparativen Ansatz

Es wurde eine Proteinlösung verwendet, die wie in Beispiel 1 vorgereinigt wurde und im selben Puffersystem vorlag. 40 l dieser Lösung wurden bei Raumtemperatur auf pH 5,2 titriert und für 60 min unter Rühren inkubiert. Fibronektin-Aggregate wurden größtenteils durch Anheften an das Rührblatt des Rührers aus der Lösung entfernt. Nach Klarfiltration

über einen Membranfilter konnte die Lösung zur Gewinnung eines VWF-Präparates weiterverarbeitet werden.

Tabelle 3: Fällung von Fibronektin in einem präparativen 40 l-Ansatz

	VWF-Ag [g/l]	Fibrinogen-Ag [g/l]	Fibronektin-Ag [g/l]
Ausgang	0,20	0,07	1,33
nach Titration und Filtration	0,19	0,03	0,13

Bei einem Verlust von nur 5% an dem Zielprotein VWF konnten 90% des Fibronektins entfernt werden.

Ergänzende Literaturstellen

Folgende Literaturstellen zu verschiedenen Analytikmethoden werden ergänzend genannt:

VWF-Aktivität:

Veyradier A, Fressinaud E, Meyer D (1998): Laboratory diagnosis of von Willebrand disease. Int J Lab Res 28 (4): 201-210.

VWF-Antigen:

Budde U, et al. (1984): Acquired von Willebrand's disease in the myeloproliferative syndrome. Blood 64 (5): 981-985.

Newman DJ, Henneberry H, Price CP (1992): Particle enhanced light scattering immunoassay. Ann Clin Biochem 29 (Pt1): 22-42.

Fibronectin-Antigen:

Sandberg L, et al. (1985): Plasma fibronectin levels in acute and recovering malnourished children. Clin Physiol Biochem. 3(5):257-264.

Colli A, et al. (1986): Diagnostic accuracy of fibronectin in the differential diagnosis of ascites. Cancer.: 58(11):2489-2493.

Fibrinogen-Antigen:

Ernst E, Resch KL (1993): Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. Ann Intern Med.: 118(12):956-963.

Jelic-Ivanovic Z, Pevcevic N (1990): Fibrinogen determination by five methods in patients receiving streptokinase therapy. Clin Chem.: 36(4):698-699.

Ansprüche:

1. Verfahren zur Abtrennung von Fibronektin aus einer Plasmafraktion, dadurch gekennzeichnet, dass man
 - (i) den pH-Wert der Plasmafraktion auf unter pH 5,4 einstellt, so dass sich ein Niederschlag bildet, wobei die Ionenstärke unter 500 mM liegt und
 - (ii) den gebildeten Niederschlag abtrennt.
2. Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung enthaltend einen Gerinnungsfaktor, umfassend dass man
 - (i) den pH-Wert einer Plasmafraktion auf unter pH 5,4 einstellt, so dass sich ein Niederschlag bildet, wobei die Ionenstärke unter 500 mM liegt und
 - (ii) den gebildeten Niederschlag abtrennt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert der Plasmafraktion auf einen Wert zwischen pH 4,7 und pH 5,3 eingestellt wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Ionenstärke unter 300 mM liegt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Ionenstärke unter 200 mM liegt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Plasmafraktion nach Einstellen des pH-Werts in Schritt (i) für mindestens 10 Minuten gerührt wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Abtrennung des Großteils des Fibronektin-Niederschlags mit dem Rührblatt eines Rührers erfolgt.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Fibronektinkonzentration in der Plasmafraktion vor Schritt (i) mindestens 0,1 g pro Liter ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration von NaCl oder KCl in der Plasmafraktion 100 - 200 mM ist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausgangslösung Glycin in einer Konzentration unter 500 mM enthält.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausgangslösung Glycin in einer Konzentration unter 200 mM enthält.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausgangslösung Glycin in einer Konzentration von 50 bis 200 mM enthält.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausgangslösung Glycin in einer Konzentration von 100 bis 150 mM enthält.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Plasmafraktion gelöstes Kryopräzipitat ist.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass das gelöste Kryopräzipitat durch Aluminiumhydroxid-Behandlung, Solvent-/Detergent-Behandlung und Anionenaustauschchromatographie vorgereinigt ist.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass man nach Schritt (ii) wenigstens einen Gerinnungsfaktor aufreinigt.
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass der Gerinnungsfaktor von Willebrand Faktor ist.
18. Gerinnungsfaktor, erhältlich durch ein Verfahren nach Anspruch 16 oder 17.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2005/009730

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K14/78 C07K14/745 C07K1/30

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1983, ZYKOVA T A ET AL: "A SIMPLE AND EFFECTIVE ADDITIONAL STEP IN PURIFICATION OF BOVINE BLOOD SERUM FIBRONECTIN" XP002352960 Database accession no. PREV198478048777 abstract & VOPROSY MEDITSINSKOI KHIMII, vol. 25, no. 5, 1983, pages 114-117, ISSN: 0042-8809	1-17
X	US 6 465 624 B1 (FISCHER BERNHARD ET AL) 15 October 2002 (2002-10-15) the whole document	18

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 November 2005

Date of mailing of the international search report

01/12/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hillenbrand, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2005/009730

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 774 323 A (NEWMAN ET AL) 27 September 1988 (1988-09-27) the whole document -----	18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2005/009730

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6465624	B1	15-10-2002	AT 405403 B 25-08-1999
			AT 33797 A 15-12-1998
			WO 9838219 A1 03-09-1998
			AU 737986 B2 06-09-2001
			AU 5847098 A 18-09-1998
			CA 2282843 A1 03-09-1998
			EP 1005492 A1 07-06-2000
			JP 2001513088 T 28-08-2001
			NO 994138 A 26-08-1999
US 4774323	A	27-09-1988	NONE

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/009730

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

C07K14/78 C07K14/745 C07K1/30

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1983, ZYKOVA T A ET AL: "A SIMPLE AND EFFECTIVE ADDITIONAL STEP IN PURIFICATION OF BOVINE BLOOD SERUM FIBRONECTIN" XP002352960 Database accession no. PREV198478048777 Zusammenfassung & VOPROSY MEDITSINSKOI KHIMII, Bd. 25, Nr. 5, 1983, Seiten 114-117, ISSN: 0042-8809	1-17
X	US 6 465 624 B1 (FISCHER BERNHARD ET AL) 15. Oktober 2002 (2002-10-15) das ganze Dokument ----- -/--	18

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. November 2005

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

01/12/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hillenbrand, G

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/009730

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>US 4 774 323 A (NEWMAN ET AL)</p> <p>27. September 1988 (1988-09-27)</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	18

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/009730

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 6465624	B1	15-10-2002	AT 405403 B 25-08-1999
		AT 33797 A 15-12-1998	
		WO 9838219 A1 03-09-1998	
		AU 737986 B2 06-09-2001	
		AU 5847098 A 18-09-1998	
		CA 2282843 A1 03-09-1998	
		EP 1005492 A1 07-06-2000	
		JP 2001513088 T 28-08-2001	
		NO 994138 A 26-08-1999	
US 4774323	A	27-09-1988	KEINE